

506,407

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
12 septembre 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/074011 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : A61K 7/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00656

(22) Date de dépôt international :
28 février 2003 (28.02.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/02675 1 mars 2002 (01.03.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LVMH
RECHERCHE [FR/FR]; 20, avenue Hoche, F-75008
Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : FRANCHI,
Jocelyne [FR/FR]; 20, Place Croix-Morin, F-45000 Or-
léans (FR). PELLICIER, Françoise [FR/FR]; 4, Clos du
Paradis, F-45470 Loury (FR).

(74) Mandataires : GIRAUD, Françoise etc.; 158, rue de
l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT (modèle
d'utilité), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ (modèle d'utilité), CZ, DE (modèle
d'utilité), DE, DK (modèle d'utilité), DK, DM, DZ, EC, EE
(modèle d'utilité), EE, ES, FI (modèle d'utilité), FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK (modèle d'utilité), SK, SL, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: COSMETIC USE OF PHYTOSPHINGOSINE AS SLIMMING AGENT AND COSMETIC COMPOSITIONS COM-
PRISING PHYTOSPHINGOSINE

(54) Titre : UTILISATION COSMÉTIQUE DE LA PHYTOSPHINGOSINE COMME AGENT AMINCISSANT ET COMPOSI-
TIONS COSMÉTIQUES CONTENANT DE LA PHYTOSPHINGOSINE

(57) Abstract: The invention concerns novel cosmetic uses of phytosphingosine or one of its cosmetically acceptable salts, in particular its hydrochloride as slimming agent and/or as active agent stimulating leptin synthesis by adipocytes, for making a cosmetic composition for reducing subcutaneous excess fat. The invention also concerns a cosmetic treatment method for obtaining a slimming effect on the human body which consists in applying on the parts of the body to be treated a cosmetic composition containing phytosphingosine or one of its cosmetically acceptable salts, in particular its hydrochloride. The invention further concerns novel cosmetic compositions containing phytosphingosine or one of its cosmetically acceptable salts, in particular its hydrochloride, associated with a lipolytic agent selected among the group consisting of the adenylate cyclase enzyme and agents inhibiting the phosphodiesterase enzyme.

(57) Abrégé : L'invention concerne de nouvelles utilisations cosmétiques de la phytosphingosine ou de l'un de ses sels cosmétique-
ment acceptables, en particulier son chlorhydrate, en tant qu'agent amincissant et/ou en tant qu'agent actif stimulant la synthèse de la
leptine par les adipocytes, pour la fabrication d'une composition cosmétique destinée à réduire les surcharges graisseuses sous-cuta-
nées. L'invention concerne également un procédé de traitement cosmétique destiné à obtenir un effet amincissant du corps humain
selon lequel on applique sur les parties du corps à traiter une composition cosmétique contenant de la phytosphingosine ou l'un de ses
sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate. Elle concerne également de nouvelles compositions cosmétiques
contenant de la phytosphingosine ou un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate, en association avec
un agent lipolytique choisi dans le groupe constitué par l'AMPc et ses dérivés. Les agents activateurs de l'enzyme adénylate cyclase
et les agents inhibiteurs de l'enzyme phosphodiesterase.

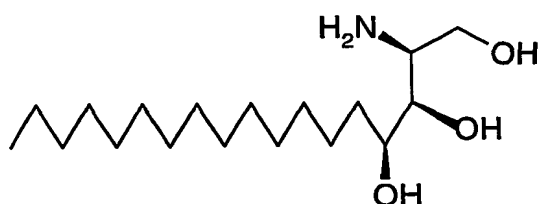
WO 03/074011 A1

Utilisation cosmétique de la phytosphingosine comme agent amincissant et compositions cosmétiques contenant de la phytosphingosine

Utilisation cosmétique de la phytosphingosine comme agent
5 amincissant et compositions cosmétiques contenant de la phytosphingosine.

La présente invention concerne une nouvelle utilisation cosmétique de la phytosphingosine, comme agent amincissant ainsi que des compositions cosmétiques contenant de la phytosphingosine.

10 La phytosphingosine répond à la formule suivante :



Sa formule moléculaire est C₁₈H₃₉NO₃ et son numéro CAS est le suivant : RN 100 000 403-19-8.

15 Ce produit est encore connu sous la dénomination :
(2S,3S,4R)-2-amino-1,3,4-octadécane-triol.

La phytosphingosine est un produit commercial qui correspond à l'une des trois bases sphingoïde naturellement présentes dans la peau, la phytosphingosine étant présente dans le stratum corneum.

20 On connaît déjà des applications de la phytosphingosine et de ses sels et, plus particulièrement de son chlorhydrate, dans le domaine de la dermatologie. En effet, la phytosphingosine est essentiellement connue pour son activité antimicrobienne ainsi que pour son activité en tant que « second messenger », application qui résulte en une réduction de la
25 sensibilité de la peau. Plus précisément, la phytosphingosine est connue pour son activité dans le traitement de l'acné, pour son activité d'inhibiteur de la croissance des microorganismes sur la peau et pour réduire différents phénomènes inflammatoires observés sur la peau.

30 Les inventeurs de la présente invention ont maintenant découvert de façon tout à fait surprenante une nouvelle utilisation de la phytosphingosine ainsi que de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier de son chlorhydrate, comme agent amincissant. Ils ont par

ailleurs mis en évidence que cette nouvelle utilisation était liée, au moins partiellement, à la propriété parfaitement inattendue de la phytosphingosine et de ses sels, de favoriser la synthèse de la leptine par les adipocytes de la peau.

5 Par ailleurs, poursuivant leurs études dans ce domaine, les inventeurs de la présente invention ont également mis en évidence qu'un certain nombre de combinaisons de la phytosphingosine ou de ses sels cosmétiquement acceptables s'avéraient particulièrement intéressantes dans ces nouvelles utilisations.

10 La leptine de la souris a été récemment identifiée en 1994 comme étant le produit du "gène ob" (Zhang, y et al., Nature, 1994, 372:425 et Tartaglia L.A., 1997, J. Biol. Chem. 272:6093).

15 La structure de la leptine humaine (ou protéine humaine OB) et son utilisation dans la modulation du poids chez les animaux ont été décrites dans la demande de brevet britannique GB 2292382. Il s'agit d'une protéine sécrétée par l'adipocyte qui informe le cerveau de l'état des réserves adipeuses. Elle agit par l'intermédiaire de récepteurs membranaires situés en particulier au niveau de l'hypothalamus.

20 D'abord étudiée chez le rongeur puis chez l'homme, elle joue un rôle clef dans la régulation du poids corporel.

Chez les souris ob/ob, l'absence de leptine dans le sérum due à des mutations du gène ob (celui qui code pour la leptine) entraîne une obésité massive.

25 Chez l'homme, les premiers travaux concernant la leptine ont été dirigés vers les patients obèses et/ou diabétiques.

En effet, plus un adipocyte possède une teneur élevée en triglycérides, plus il produit de leptine, et inversement (Médecine/Sciences, 1998, n°8-9, 14, 858-864, G. Ailhaud : L'adipocyte, cellule sécrétrice et endocrine).

30 Ainsi chez les obèses, deux situations peuvent se présenter. Soit il existe une mutation du gène de la leptine, celle-ci est alors non fonctionnelle, en particulier sur les récepteurs du cerveau. Soit il existe un défaut du transfert de la leptine au niveau de la barrière entre circulation sanguine et cerveau.

35 Une étude, au cours de laquelle une injection quotidienne de leptine synthétique a été réalisée sur des patients qui souffraient d'obésité

ou de surcharges pondérales a montré des résultats probants : une perte de poids significative chez les patients atteints d'une certaine forme d'obésité est apparue (travaux menés à la Tufts University aux Etats-Unis, présentés à l'occasion du congrès American Diabetes Association : Jean
5 Mayer, USA Human Nutrition Research Center on Aging).

En fait, la leptine déclenche un phénomène de satiété provoquant une diminution de la prise alimentaire et diminuant la fréquence des prises alimentaires.

Lorsque la masse adipeuse augmente, la leptine produite par le
10 tissu adipeux va inhiber la prise alimentaire et stimuler la dépense énergétique. Elle va donc s'opposer ainsi à une prise de poids excessive.

Ainsi donc, on peut considérer que cette protéine est un régulateur de la masse adipeuse dont le rôle primordial est d'inhiber le dépôt d'adiposité en excès.

15 Le rôle de régulation locale joué par la leptine est bien connu (voir Systemically and Topically Administered Leptin Both Accelerate Wound Healing in Diabetic ob/ob Mice. B.D. Ring, S. Scully, C.R. Davis, M.B Baker, M.J. Cullen, M.A. Pelleymounter, D. Danilenko. Endocrinology, 2000 vol. 141, n°1, p. 446-449).

20 Par ailleurs, le rôle de la leptine dans l'expression de certains gènes conduisant à l'accumulation de lipides (gènes de différenciation) est également bien connu dans le cadre de la régulation de la lipolyse.

La leptine, d'une part réprime l'expression de certains gènes conduisant à l'accumulation de lipides (gènes de différenciation), et cela
25 sans la participation du cerveau.

D'autre part, la leptine induit une lipolyse directement sur les adipocytes. Ceci a été observé sur des adipocytes de souris in vitro (voir In vitro Lipolytic Effect of Leptin on Mouse Adipocytes : Evidence for a possible Autocrine/Paracrine Role of Leptin, G. Frühbeck, M. Aguado, J.A.
30 Martinez, Biochemical and Biophysical Research communications 1997 : 240, p. 590-594). L'effet de la leptine sur la lipolyse des adipocytes est spécifique et opère via des récepteurs présents dans le tissu adipeux blanc.

La leptine transforme l'oestrone de la circulation sanguine
35 (hormone qui augmente le dépôt de lipides) en oléyl-oestrone qui est considéré comme un facteur "amincissant". L'apparition de ce facteur

provoque une lipolyse généralisée et une thermogénèse (voir Leptin enhances the synthesis of oleyl-estrone from estrone in white adipose tissue, M. Esteve, J. Virgili, H. Aguilar, F. Balada, J.A. Fernandez-Lopez, W. Remesar, M. Alemany, Eur J. Nutr. 1999, 38, p. 99-104). Administrée à
5 des rats obèses ou normaux, l'oléyl-oestrone provoque une perte de masse grasse.

On voit donc tout l'intérêt qu'il y a à disposer d'un moyen pour agir sur la synthèse de la leptine qui agira notamment:

- directement au niveau cutané par l'intermédiaire des
10 récepteurs présents à ce niveau,
- sur le tissu adipeux en provoquant la lipolyse,
- sur un facteur agissant comme régulateur du poids, à savoir l'oléyl-oestrone.

Des essais réalisés dans le cadre de la présente invention, aussi
15 bien sur des cultures d'adipocytes murins que sur des cultures d'adipocytes humains ont permis de montrer qu'il était possible, par traitement de ces cultures avec de la phytosphingosine ou l'un de ses sels, en particulier son chlorhydrate, de stimuler la synthèse de la leptine par ces adipocytes, ce qui laissait présager la possibilité d'utiliser la
20 phytosphingosine ou ses sels comme agent amincissant. Cet effet a pu être confirmé.

Ainsi donc, la présente invention concerne selon un premier aspect une nouvelle utilisation cosmétique de la phytosphingosine ou d'un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate,
25 en tant qu'agent amincissant pour la fabrication d'une composition cosmétique destinée à réduire les surcharges graisseuses sous-cutanées.

Selon un deuxième aspect, l'invention concerne une nouvelle utilisation cosmétique de la phytosphingosine ou de l'un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier de son chlorhydrate, comme
30 agent actif stimulant la synthèse de la leptine par les adipocytes, pour la fabrication d'une composition cosmétique destinée à réduire les surcharges graisseuses sous-cutanées.

Selon un troisième aspect, l'invention concerne un procédé de traitement cosmétique destiné à obtenir un effet amincissant du corps
35 humain, selon lequel on applique sur les parties du corps où ledit effet est recherché une quantité efficace d'une composition cosmétique contenant

de la phytosphingosine ou l'un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate.

Par ailleurs, il est apparu que, selon les trois aspects de l'invention tels qu'ils sont définis ci-dessus, certaines combinaisons de phytosphingosine ou d'un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier de son chlorhydrate s'avéraient particulièrement intéressantes, pour améliorer l'effet amincissant obtenu par application de l'une quelconque des compositions contenant ces associations particulières.

Plus précisément, il est apparu que l'association de la phytosphingosine ou d'un de ses sels cosmétiquement acceptables, avec un ou plusieurs agents, ci-après désignés par agents lipolytiques, induisant une lipolyse, dans les adipocytes s'avérait particulièrement intéressante dans le cadre de la présente invention, comme cela sera expliqué plus loin.

En particulier, on choisira pour réaliser cette association au moins un agent lipolytique cosmétiquement acceptable dans le groupe constitué par l'adénosine-3',5'-cyclique monophosphate (AMPC) et ses dérivés, les agents activateurs de l'enzyme adénylate cyclase et les agents inhibiteurs de l'enzyme phosphodiesterase.

Comme agent activateur de l'adénylate cyclase, on choisira avantageusement la forskoline ou un extrait de plante en contenant, tel qu'un extrait de *Coleus forskohlii* ou *Plectranthus barbatus*, ou encore un extrait de la plante *Tephrosia purpurea*.

Comme agent inhibiteur de phosphodiesterase, on pourra utiliser une xanthine telle que la 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine ou IBMX, la caféine ou la théophylline.

Les compositions cosmétiques renfermant de telles associations, qui sont nouvelles en elles-mêmes, constituent le quatrième aspect de la présente invention. Ce sont ces compositions telles qu'elles sont décrites ci-après qui seront de préférence mises en oeuvre dans toutes les applications cosmétiques visées par la présente invention.

Ainsi donc selon ce quatrième aspect, la présente invention concerne une composition cosmétique, notamment destinée à réduire les surcharges graisseuses sous-cutanées, caractérisée en ce qu'elle contient, à titre d'agent actif,

- de la phytosphingosine ou un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate et
 - au moins un agent lipolytique cosmétiquement acceptable choisi dans le groupe constitué par l'AMPc et ses dérivés cosmétiquement acceptables,
- 5 les agents activateurs de l'enzyme adénylate cyclase et les agents inhibiteurs de l'enzyme phosphodiesterase, dans un véhicule cosmétiquement acceptable.

10 Dans les compositions nouvelles de l'invention qui sont également les compositions préférées pour la mise en oeuvre des différentes applications visées par la présente invention, la phytosphingosine ou l'un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate, est contenu dans la composition cosmétique à une concentration comprise entre 0,001 % et 1 % et, de préférence, entre 0,05 % et 0,5 % en poids par rapport au poids total de ladite composition.

15 La composition cosmétique contient en outre au moins un agent actif lipolytique choisi dans le groupe constitué par l'AMPc et ses dérivés lipolytiques, les agents activateurs de l'enzyme adénylate cyclase et les agents inhibiteurs de l'enzyme phosphodiesterase.

20 Dans ces compositions cosmétiques, l'AMPc ou son dérivé sera avantageusement utilisé à une concentration comprise entre 0,001 % et 5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

A titre de dérivé de l'AMPc, on pourra choisir tout dérivé de l'AMPc cosmétiquement acceptable et en particulier un sel ou un dérivé acylé, notamment un dérivé mono- ou dibutyryle.

25 A titre d'agent activateur de l'enzyme adénylate cyclase, on choisit, de façon avantageuse, la forskoline ou un extrait de plante en contenant, de préférence à une concentration comprise entre 0,001 % et 1 % et, de préférence entre 0,05 % et 0,25 %, en poids par rapport au poids total de la composition.

30 Comme extrait contenant de la forskoline, on choisira de préférence un extrait de *Coleus forskohlii* ou *Plectranthus barbatus*. Un tel extrait peut être obtenu par un procédé d'extraction tel que celui décrit dans la demande internationale WO 91/02516.

35 On pourra également utiliser comme agent activateur de l'adénylate cyclase un extrait de la plante *Tephrosia purpurea*, à une concentration comprise entre 0,001 % et 5 %, de préférence entre

0,01 % et 5 %, en poids par rapport au poids total de la composition. Un tel extrait peut être obtenu par un procédé d'extraction tel que celui décrit dans la demande internationale WO 95/03780.

Enfin, comme exposé précédemment, selon une autre variante,
5 les compositions préférées selon l'invention contiennent un agent inhibiteur de la phosphodiesterase, en particulier une xanthine et, tout particulièrement, la 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine (IBMX), la caféine ou la théophylline, de préférence à une concentration comprise entre 0,001 % et 10 %, de préférence entre 0,01 et 1 %, en poids par rapport au poids de
10 la composition.

Les compositions préférées utilisées selon la présente invention et qui contiennent une association de phytosphingosine ou de l'un de ses sels avec un agent lipolytique tel que l'AMPc et ses dérivés lipolytiques, les agents activateurs de l'adénylate cyclase et les agents inhibiteurs de la
15 phosphodiesterase, s'avèrent particulièrement intéressantes du fait de l'action synergique des deux types de constituants.

Sans que les inventeurs de la présente invention s'estiment totalement liés par cette explication, une interprétation plausible de l'effet de synergie observé est donnée ci-après.

20 Il a en effet été déjà observé que les agents favorisant une lipolyse dans les adipocytes, tels que les extraits de Coleus par exemple, présentent une efficacité biologique remarquable qui associe en général un important pouvoir lipolytique à une activité inhibitrice de la maturation adipocytaire. La réduction importante en volume et en quantité des
25 vacuoles lipidiques après un traitement par l'agent lipolytique conduit à une réduction de la production de leptine. Il est donc probable que cette perte locale de leptine dans l'environnement proche des adipocytes résultant du traitement par l'agent lipolytique puisse être compensée par l'effet d'un produit stimulant la synthèse de la leptine, dans le cas présent
30 par la phytosphingosine ou son sel. Le maintien d'une concentration suffisante en leptine dans l'environnement proche des adipocytes exerce ainsi un rôle qui s'oppose à l'augmentation de la masse adipeuse. Tout semble donc se passer comme si le message était émis par des cellules grasses qui informent par une opération de rétro-contrôle de la nécessité
35 de réduire le stockage sous forme de triglycérides. Ainsi, grâce à l'action combinée de la phytosphingosine ou de l'un de ses sels, et d'au moins un

autre agent lipolytique, on obtient un effet amincissant renforcé et plus prolongé.

Cette hypothèse semble tout à fait confirmée par les résultats obtenus dans le cadre des exemples 2 et 4 de la présente invention portant sur l'association de la phytosphingosine avec un extrait de *Coleus forskohlii*.

Les exemples qui suivent sont donnés à titre purement illustratif de la présente invention. Ils sont accompagnés des figures 1 à 6, qui représentent respectivement :

- 10 - figure 1 : l'effet sur la lipogénèse de différents traitements réalisés à l'exemple 2 ;
- figures 2 à 4 : la morphologie des adipocytes murins à différentes étapes du traitement selon l'exemple 2 ;
- figure 5 : la morphologie des adipocytes humains à J18 pour une solution témoin (selon l'exemple 3) ; et
- 15 - figure 6 : la morphologie des adipocytes humains à J18 pour un traitement par une association selon l'invention (selon l'exemple 3).

EXEMPLES

- 20 Dans les exemples qui suivent et, sauf indications contraires, les proportions sont indiquées en pourcentage en poids.

Exemple 1

- 25 Mise en évidence de l'activité stimulante de la phytosphingosine sur la production de leptine par des adipocytes murins en culture.

1. Principe du test

Le concept selon lequel la masse adipeuse peut être régulée via des facteurs circulants sécrétés est très intéressant.

- 30 Le principe du test est de contrôler la sécrétion de la leptine par les adipocytes.

2. Matériel et méthodes

- Culture de cellules 3T3 F442A

A partir d'une lignée établie de préadipocytes de souris 3T3, a été isolé un clone qui a la capacité d'accumuler de grandes quantités de triglycérides. Les agents lipolytiques réduisent cette accumulation. Il est donc apparu pertinent de tester des agents lipolytiques potentiels sur cette lignée de préadipocytes murins 3T3 F442A. Ces préadipocytes (GREEN H. and KEHINDE O. – Spontaneous Heritable Changes Leading to Increased Adipose Conversion in 3T3 Cells, Cell Vol. 7, 105-113, 1976) peuvent se multiplier et se différencier en présentant le phénotype morphologique et biochimique caractéristique de la fonction différenciée de l'adipocyte mature. Lorsqu'ils sont en phase exponentielle de croissance, ils sont d'apparence fibroblastique, présentent une forme allongée et sont très adhérents au support. A confluence lorsque les conditions le permettent, une transition morphologique très précoce leur confère une forme arrondie.

Les cellules connaissent alors un processus d'amplification clonale. A ces changements morphologiques s'ajoutent des accroissements de l'activité d'enzymes lipogénétiques ainsi que des augmentations de réponses de la part des cellules à des hormones/facteurs affectant la lipogénèse et la lipolyse.

Les préadipocytes 3T3 F442A constituent donc un excellent modèle d'étude de la lipolyse du fait des transformations morphologiques et métaboliques acquises par les cellules pendant leur programme de développement. (Pairault J and Lasnier F : Control of adipogenetic differentiation of 3T3 F442A cells by retinoic acid, dexamethasone and insulin : a topographic analysis J. cell Physiol. 1987, 132, 279-86).

D'après la littérature, la leptine est sécrétée dans le milieu de culture puisqu'elle est stockée dans les adipocytes. (Wabitsch M et al, Diabetes, 1996, vol 45, Bornstein S. et al, Diabetes, 2000, vol 49, Friedman JM, Nutrition Reviews, 1998, vol 56 n°2).

Dans les cellules 3T3 F442A, l'expression du gène ob a été particulièrement étudié (Leroy P et al, J. of Biol. Chem, 1996, vol 271 n°5, pp. 2365-2368, Considine RV et al – Horm. Res. 1996, 46 : 249-256).

Les préadipocytes 3T3 F442A sontensemencés à J0 dans les boîtes de Pétri 35 mm (Corning) et mis à l'étuve à 37°C sous une

atmosphère air-CO₂ (95-5). Les cellules sont cultivées dans un milieu essentiel minimum de Eagle modifié selon Dulbecco (glucose 4,50 g/l) (DMEM-GIBCO BRL) complémenté avec 5 % de sérum de veau (SV) (BIOMEDIA®) et 5 % de sérum de veau foetal (GIBCO) pendant la phase de croissance. Le milieu est changé à J2 et J4.

A la confluence cellulaire (à J7), le milieu est changé :

Le milieu de base reste le même (DMEM) mais est supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) et de l'insuline (5 µg/mL) (SIGMA).

Le milieu est ensuite changé à J9 et J11.

A J14, J16 et J18, on effectue un traitement par la composition dont on veut contrôler l'efficacité sur la synthèse de la leptine.

Le protocole est résumé dans le tableau ci-dessous :

J0	Ensemencement des 3T3 F442A dans DMEM, 5 % SV, 5 % SVF – densité cellulaire 2×10^4 cellules / boîte de Pétri 35 mm
J2	Changement de milieu
J4	Changement de milieu
J7	Confluence – Milieu de culture DMEM, 10 % SVF, 1 % insuline (solution mère à 500 µg/mL)
J9 et J11	Changement de milieu
J14	Traitement par la composition à tester
J16 et J18	Traitement par la composition à tester
J21	Collecte des surnageants cellulaires

3. Dosage de la leptine

La leptine sécrétée est déterminée au moyen d'une technique Elisa de type sandwich en recourant au kit Quantikine® M-Mouse Leptin Immunoassay.

Ce dosage ELISA utilise la leptine de souris recombinée, exprimée dans E.Coli et des anticorps dirigés contre la leptine recombinante de souris.

Le test utilise une technique immunoenzymatique "en sandwich". On tapisse les puits des microplaques avec un anticorps polyclonal de la leptine de souris.

5 Les standards, contrôles et échantillons sont déposés dans les puits et à ce moment là, toute la leptine présente se lie à l'anticorps immobilisé.

La leptine liée est ensuite détectée par un anticorps anti-leptine de souris couplé à une enzyme, la peroxydase. Une solution substrat est ensuite ajoutée dans les puits. La réaction enzymatique conduit à une
10 solution bleue qui vire au jaune après ajout d'une solution d'arrêt.

L'intensité de la couleur mesurée est proportionnelle à la quantité de leptine présente. La lecture de la densité optique est faite à 450 nm au spectrophotomètre.

On obtient après le dosage des courbes doses-réponses
15 concernant la mesure de la leptine naturelle, parallèle aux courbes standard obtenues avec les standards Quantikine M "recombinants". Le kit Quantikine M permet donc de déterminer des valeurs en masse relative pour la leptine de souris naturelle.

La densité optique mesurée à 450 nm est proportionnelle à la
20 quantité d'anticorps fixé, elle-même proportionnelle à la quantité de leptine initialement présente. Les résultats sont exprimés en pg/mL de leptine présents dans les surnageants cellulaires.

Les échantillons ont été testés en triplicate.

25 4. Résultats

Trois compositions contenant respectivement 0,25, 1 et 2 µg/mL de phytosphingosine ou de son chlorhydrate ont été testées.

Pour les adipocytes 3T3-F442A maintenus en culture sans aucun traitement, la quantité de leptine présente dans les surnageants de
30 culture, augmente fortement au cours du temps (16.4 pg/mL à J4, 802 pg/mL à J11 et 2623 pg/mL à J20). Ce résultat est en conformité avec les données bibliographiques (Leroy P. 1996, Considine RV. 1996) : dans des conditions basales, les adipocytes murins sécrètent des quantités croissantes de leptine tout au long de leur maturation. Nous confirmons
35 ainsi qu'un adipocyte mature sécrète des quantités de leptine supérieures à celles d'un préadipocyte.

Dans le tableau 1 ci-dessous sont reportés les quantités de leptine présentes dans les surnageants. L'abréviation PS désigne la phytosphingosine.

5

Tableau 1

Quantité de leptine, exprimée en pg/mL présente dans les surnageants de culture d'adipocytes 3T3-F442A matures traités par la phytosphingosine au jour J21

10

phytosphingosine (µg/mL)	leptine (pg/mL)	
	moyenne	écart
O (témoin)	1510	23,43
0,25	1789	11,27
1	1563,6	14,33
2	1428,8	200

15

Après 7 jours de traitement, c'est à dire au jour J21, la phytosphingosine induit une augmentation de la sécrétion de leptine par les adipocytes traités, effet qui est maximal à la concentration de 0,25 µg/mL. A cette concentration, l'augmentation est d'un peu plus de 18%.

20

Testé dans les mêmes conditions, le chlorhydrate de phytosphingosine est responsable également d'une stimulation de la sécrétion de leptine : + 52% à 1 µg/mL et + 26% à 2 µg/mL et + 18% à 0.25 µg/mL. Les résultats pour le chlorhydrate sont reportés au tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2

- 5 Quantité de leptine, exprimée en pg/mL présente dans les surnageants de culture d'adipocytes 3T3-F442A matures traités par le chlorhydrate de phytosphingosine au jour J21

phytosphingosine- HCl (µg/mL)	leptine (pg/mL)	
	moyenne	écart
0 (témoin)	1510	23,43
0,25	1789	201,79
1	2301,3	49,821
2	1907,9	31,93

- 10 Ainsi, la phytosphingosine est capable d'induire dans la cellule adipeuse 3T3-F442A, modèle très proche de l'adipocyte humain, une augmentation de la sécrétion adipocytaire basale de leptine. La phytosphingosine est donc capable de jouer un rôle important dans le contrôle de la stabilité de la masse graisseuse.

Exemple 2

- 15 Mise en évidence de l'intérêt de l'association de la phytosphingosine avec un activateur d'adénylate cyclase, tel qu'un extrait de *Coleus forskohlii*, pour favoriser la diminution de la lipogénèse dans les adipocytes murins en culture.

20 1. Principe de l'étude

Cette étude concerne les effets de l'association des 2 actifs *Coleus forskohlii* (encore nommé *Plectranthus barbatus*) (PB) et Phytosphingosine (PS) sur le recrutement de nouveaux adipocytes.

- 25 Il est connu que le développement du tissu adipeux blanc représente un processus continu tout au long de la vie (AILHAUD G., GRIMALDI P., NEGREL R., Trends in Endocrinology and Metabolism, (1994) 5 (3) 132-6). L'adipocyte est associé au sein du tissu adipeux, à une abondante matrice extracellulaire qui renferme également des cellules endothéliales, des capillaires, des fibres nerveuses et des fibroadipoblastes

précurseurs. L'adipocyte mature représente le phénotype d'une cellule issue de la différenciation d'un précurseur adipocytaire. Les préadipocytes sont présents au sein même du tissu adipeux et peuvent être recrutés à tous les stades de la vie pour générer de nouveaux adipocytes : dans le cas d'un gain de poids, il existe une phase initiale d'augmentation de volume adipocytaire jusqu'à atteindre un point critique, conduisant ensuite au recrutement de nouvelles cellules (Bjorntorp P., Int. J. Obesity, (1991) 15 67-81). La capacité intrinsèque des préadipocytes à se multiplier et à se différencier en adipocytes joue un rôle déterminant dans le développement des masses graisseuses. Une hyperplasie de ces cellules apparentées aux fibroblastes conduit à une augmentation du tissu adipeux.

Ainsi, dans un premier temps, des adipocytes matures sont traités par PB + PS

Dans un deuxième temps, le milieu de culture conditionné par ces adipocytes est mis en contact avec des préadipocytes dont on va suivre la maturation en adipocytes.

Les cellules témoins au début du traitement, commencent à se différencier et subissent un certain nombre de changements : augmentation de volume, augmentation du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques, accroissement de l'activité d'enzymes lipogénétiques etc.

Une enzyme clé dans le processus de synthèse des triglycérides est la glycérol-3-phosphate deshydrogénase (G₃PDH): son activité spécifique augmente considérablement au cours de la maturation et peut donc être utilisée comme une mesure précise et sensible de la conversion adipocytaire (Pairault J., Green H., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (1979) 76, 5138-42; Koekemoer T.C. et al, Int. J. Biochem. Cell Biol. (1995) 27, 625-32).

On a choisi de suivre l'évolution de l'activité de cette enzyme pour mesurer l'état de différenciation des adipocytes.

La G₃PDH étant une enzyme hydrosoluble, on mesure son activité dans le surnageant du broyat cellulaire en présence des substrats appropriés (NADH, TEA (triéthanolamine) - EDTA, 50 mM, 1 mM).

A partir des dosages, l'activité spécifique est calculée. On compare les cellules traitées aux cellules témoins. La G₃PDH étant le reflet

de l'état de différenciation des cellules, plus son activité spécifique est importante et plus les cellules sont différenciées et inversement : plus la réserve de graisse sera limitée par l'agent testé plus l'activité de la G₃PDH sera faible.

- 5 La moyenne sur trois mesures rapportées à un écart type donne l'activité spécifique moyenne, ensuite on calcule le pourcentage d'inhibition de l'activité de la G₃PDH produit par les substances comparé aux témoins.

- 10 Les critères permettant d'assurer la qualité de bons agents anti-lipogénétiques sont d'une part un pourcentage d'inhibition de l'enzyme supérieur à 50 % et d'autre part des données brutes significativement différentes par rapport aux témoins.

2. Matériel et méthodes

15 a) Culture et traitements

- Les adipocytes en cours de différenciation, adipocytes peu matures encore dénommés préadipocytes obtenus à J7 du protocole donné dans l'exemple 1 sont traités par du milieu conditionné par des adipocytes différenciés matures traités ou non par PB ou PS et par 20 l'association PB + PS pendant 8 jours avec un changement de milieu aux jours J9 et J11, comme indiqué dans le protocole ci-après.

La phytosphingosine a été testée aux concentrations finales de 0,25, 0,50 et 1 µg/mL.

- 25 L'extrait de *Plectranthus barbatus* (PB) (lot n° 0B2, INDENA) est titré à 80 % en forskoline, molécule reconnue pour être effectrice de l'adénylate cyclase (Seamon K. et al., P.N.A.S. USA, (1981) 78 3363-67). La concentration de PB utilisée dans l'étude est de 25 µg/mL à partir d'une solution mère à 20 mg/mL dans l'éthanol.

30 b) Préparation des extraits cellulaires

Le tapis cellulaire est lavé 2 fois avec du tampon PBS et les cellules sont récupérées par grattage dans du tampon 25 mM, TRIS - HCl, pH 7,5 contenant 1 mM d'EDTA à 4°C. Les cellules sont homogénéisées par broyage et centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C.

Le protocole suivi est résumé dans le tableau ci-dessous.

J0	Ensemencement des 3T3F442A - densité cellulaire 2 x 10 ⁴ cellules / boîte de Pétri 35 mm. Milieu de culture DMEM, 5% <u>SVE</u> /5 % <u>SV</u> .
J2	Changement de milieu
J4	Changement de milieu
J7	Confluence - Milieu de culture DMEM, 10 % <u>SVE</u> , 1 % insuline (SM 500 µg/mL) Traitement par les milieux conditionnés : PB : 0,25 µg/mL PS : 0,5 et 1 µg/mL
J9-J11	Changement de milieu, même milieu + traitement
J14	Traitement, même milieu de culture
J16	Recueil des surnageants et dosage G ₃ PDH

c) Détermination de l'activité glycéro-3-phosphate

5 déshydrogénase (G₃PDH)

Le dosage de l'activité G₃PDH est effectué selon la méthode de Kozak et Jensen : Kozak et Jensen, 1974, J. Biol. Chem., 249, 7775-7781.

La G₃PDH catalyse la réaction suivante :



15 On mesure en spectrophotométrie (KONTRON) à 340 nm, la consommation de NADH en fonction du temps. On peut calculer ainsi une variation d'absorbance/minute (Δ Abs/minute) qui correspond à la vitesse initiale de la réaction enzymatique. Les résultats sont exprimés en activité spécifique (AS) soit en nmoles de NADH transformées/min/mg de protéines. Le taux de protéines totales est évalué par la méthode du BCA (Protein Assay Reagent-PIERCE LTD)

20
$$AS = 81,25 \times \Delta \text{ Abs/min} \times \frac{1}{\text{mg de protéines}}$$

3. Résultats

Mesure de l'activité glycéro-3-phosphate déshydrogénase (G₃PDH).

Les quantités de NAD⁺ au bout de 8 jours en fonction des
5 traitement des cultures sont reportées dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3

10 Appréciation de la lipogénèse par mesure de la DO,
exprimée en nmoles NAD⁺, pour l'extrait de PB
et pour la phytosphingosine PS

PB (µg/mL)	PS (µg/mL)	D.O. (nmoles NAD ⁺)	
		moyenne	écart
0 (témoin)	0 (témoin)	0,0016	0,000195
25	0	0,0004	0,000015
0	0,5	0,0014	0,00009
0	1	0,00165	0,00006
25	1	0,00036	0,00002
25	0,5	0,00043	0,000048

Les résultats du tableau 3 ci-dessus sont également représentés
à la figure 1.

15 Après 8 jours de contact avec les milieux conditionnés par des
adipocytes matures, nous observons un ralentissement de la maturation
des préadipocytes avec les milieux contenant du PB (inhibition de l'activité
de la G₃PDH), ce qui correspond à une inhibition du recrutement des
préadipocytes, dont l'activité de l'enzyme marqueur de maturation est
20 inhibée de 75 %.

La phytosphingosine ne modifie pas ce profil anti-
lipogénétique : l'association PS+PB provoque entre 74 et 79 % d'inhibition
de l'activité de la G₃PDH, l'association PS 1 µg/mL + PB 25 µg/mL

entraîne même un ralentissement de la lipogenèse de ces préadipocytes en cours de maturation légèrement supérieur au PB seul.

b) Analyse de la morphologie des adipocytes

- 5 Parallèlement, la morphologie des adipocytes a été analysée par observation directe des cellules dans les boîtes de Pétri, sous microscope à phase inverse (Olympus BH2). Les cellules sont considérées comme différenciées par analyse morphologique lorsqu'elles acquièrent un contour rond et que leur cytoplasme est rempli de gouttelettes lipidiques.
- 10 Inversement, une diminution de la quantité de vacuoles lipidiques associée à une forme plus allongée témoigne d'un ralentissement de cette maturation.

- En présence de l'association PS+PB, les cellules sont caractérisées par une délipidation très marquée des adipocytes ce qui est en accord
- 15 avec la baisse d'activité de l'enzyme G₃PDH précédemment mesurée.

Les figures 2, 3 et 4 montrent respectivement:

- Figure 2: les cellules d'une culture témoin à J7. Dans cette culture, les cellules sont très peu différenciées, il y a peu de vacuoles lipidiques. C'est le début du traitement.

- 20 Figure 3: les cellules d'une culture témoin à J21. Les cellules se sont chargées en vacuoles lipidiques.

Figure 4: les cellules d'une culture traitée par l'association PB 25 µg/mL + PS 1 µg/mL

- 25 c) Conclusion

- Cette étude montre que le traitement par l'association PB+PS d'adipocytes matures véhicule une information capable de ralentir globalement l'accumulation de triglycérides dans des préadipocytes. La baisse d'activité de l'enzyme lipogénétique G₃PDH conduit à une déplétion
- 30 en gouttelettes lipidiques intracellulaires importantes.

L'adjonction de phytosphingosine capable de stimuler la sécrétion de leptine, n'a pas inhibé l'action massive du PB sur le déstockage de lipides.

- 35 Le maintien de leptine dans l'environnement proche des adipocytes pourrait ainsi exercer son rôle de molécule signal s'opposant à l'augmentation de la masse adipeuse. On est tenté de penser qu'un

ensemble de cellules contenant des cellules vidées d'une partie de leur contenu en triglycérides par lipolyse en continuant à émettre un message leptinique en rétrocontrôle devrait contribuer à la réduction du stockage de graisse par le pannicule adipeux.

5

Exemple 3

Mise en évidence, sur des adipocytes humains en culture, de l'activité de la phytosphingosine et de l'association de la phytosphingosine avec un extrait de *Coleus forskohlii*, sur la production de la leptine et sur la lipolyse

10

Des adipocytes humains provenant d'une plastie d'une femme âgée de 41 ans, commercialisés par ZEN-BIO (USA), ont été utilisés à un stade avancé de la maturation adipocytaire. La réception de ces cellules en culture a eu lieu 16 jours après l'ensemencement. Ils sont cultivés dans un milieu spécifique assurant leur différenciation durant tout le traitement.

15

J -16: ensemencement

J 0: début du traitement par l'extrait de *Coleus* (PB) et/ou la phytosphingosine (PS)

20

J 6 à J 18 : dosages des différents paramètres.

Dans un premier temps, les propriétés du *Coleus* décrites précédemment pour les adipocytes murins 3T3F442A ont été vérifiées sur ces cellules humaines : activité lipolytique par mesure de la libération de glycérol et d'acides gras non estérifiés.

25

Le tableau 4 ci-dessous indique les valeurs de libération de glycérol dans les cultures témoin et traitées par la PS.

Tableau 4

Libération de glycérol, exprimée en $\mu\text{g/mL}$,
 par les adipocytes humains en culture, traités ou non
 5 par 25 $\mu\text{g/mL}$ de phytosphingosine, en fonction de la durée de culture

Jours	glycérol (pg/mL)	
	Témoin (PS = 0 $\mu\text{g/mL}$)	PS = 25 $\mu\text{g/mL}$
3	73,78	174,4
6	120,8	196,2
9	147,2	302,9
12	198,4	416,4
15	196,3	460,6
18	230,9	659,8
21	276,6	777,1
23	238,9	687

Il apparaît très clairement que le Coleus stimule très fortement
 10 la lipolyse adipocytaire (+128 % d'augmentation de libération de glycérol
 à 18 jours par rapport au témoin)

Par une mesure de libération d'acides gras non estérifiés, on
 observe de plus que le Coleus provoque une forte hydrolyse des
 triglycérides adipocytaires en libérant parallèlement au glycérol une
 15 grande quantité d'acides gras non estérifiés à la dose 25 $\mu\text{g/mL}$.

D'autres essais montrent que la phytosphingosine induit chez
 les adipocytes humains comme chez les adipocytes murins une
 augmentation de la sécrétion de leptine, les doses les plus efficaces étant
 inférieures pour l'adipocyte humain.

20 Parallèlement à la libération de leptine, la phytosphingosine à la
 dose de 6 ng/mL est responsable d'une libération dans le temps de
 glycérol sans libération concomitante d'acides gras non estérifiés. Cette
 observation pourrait correspondre à une nouvelle forme de lipolyse
 propre à la leptine, déjà décrite dans des publications.

25 Les figures 5 et 6 présentent l'évolution de la morphologie des
 cellules dans les conditions qui viennent d'être évoquées.

La figure 5 présente une culture témoin d'adipocytes humains au jour J18.

On y voit nettement une importante quantité de vacuoles grasses.

La figure 6 présente une culture d'adipocytes humains au jour J18, après traitement par l'association de Coleus (25 µg/mL) avec la phytosphingosine (6ng/mL). Il apparaît clairement que l'association phytosphingosine - Coleus entraîne un déstockage massif et visible, avec des gouttelettes lipidiques moins nombreuses et de taille inférieure. Parallèlement, un plus grand nombre de cellules reprennent une apparence de cellules peu matures (forme allongée et absence de vacuoles lipidiques).

Ainsi, l'association de ces deux actifs conduit à une puissante réduction du stock graisseux, la modulation de leptine dans l'environnement proche de l'adipocyte humain étant une étape clé de cette action.

Exemple 4

Formule hydro/alcoolique amincissante.

20	Eau	qsp 100 %
	Alcool dénaturé	42 %
	PPG-3 myristyl éther	10 %
	Parfum	0,20 %
	Phytosphingosine	0,10%

25

Exemple 5

Emulsion fluide amincissante.

	PPG-2 isoceteth-20 acétate	2 %
	Poloxamer 407	0,50 %
30	Propylène glycol isoceteth-3 acétate	15 %
	Pentacyclométhicone	15 %
	Eau	qsp.100 %
	Butylène glycol	3 %
	Conservateurs	q.s.
35	Extrait de Coleus forskohlii (à 80 % de forskoline)	0,1 %
	Gomme xanthane	0,05%
	Acrylates/c10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,04%

	Neutralisant	q.s.
	Polyacrylamide c13-14 isoparaffin laureth-7	0,50%
	Parfum	0,20%
	Phytosphingosine	0,05%
5		
	<u>Exemple 6</u>	
	Crème amincissante.	
	Steareth-2	0,50%
	Steareth-21	1,75%
10	Alcool cétylique	0,30%
	Alcool stéarylique	0,30%
	Acide stéarique	0,50%
	Stearate éthyle-2-hexyle	4,00%
	Cetearyl isononanoate	3,00%
15	Squalane	4,00%
	IBMX	1,00%
	Diméthicone	0,40%
	Eau qsp.100.00%	
	Glycérine	2,00%
20	Butylène glycol	3,00%
	Conservateurs	q.s.
	Acrylates/c10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,35%
	Gomme xanthane	0,10%
	Sodium hyaluronate	0,02%
25	Neutralisant	q.s.
	Polyacrylamide c13-14 isoparaffin laureth 7	0,50%
	Alcool dénaturé	5,00%
	Parfum	0,20%
	Phytosphingosine	0,002%
30		

REVENDEICATIONS

1. Utilisation cosmétique de la phytosphingosine ou de l'un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate, en tant qu'agent amincissant pour la fabrication d'une composition cosmétique destinée à réduire les surcharges graisseuses sous-cutanées.

2. Utilisation cosmétique de la phytosphingosine ou de l'un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate, comme agent actif stimulant la synthèse de la leptine par les adipocytes, pour la fabrication d'une composition cosmétique destinée à réduire les surcharges graisseuses sous-cutanées.

3. Utilisation cosmétique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la phytosphingosine ou l'un de ses sels, en particulier son chlorhydrate, est utilisé à une concentration comprise entre 0,001% et 1%, et de préférence entre 0,05% et 0,5% en poids par rapport au poids total de ladite composition.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la phytosphingosine ou son sel cosmétiquement acceptable, en particulier son chlorhydrate, est utilisé pour la fabrication de ladite composition en combinaison avec au moins un agent lipolytique cosmétiquement acceptable.

5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit agent lipolytique est l'adénosine-3',5'-cyclique monophosphate (AMPc) ou l'un de ses dérivés cosmétiquement acceptables, choisi de préférence parmi ses sels et ses dérivés acylés, notamment un dérivé mono- ou dibutyryle.

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'AMPc ou son dérivé est utilisé à une concentration comprise entre 0,001 % et 5 % en poids par rapport au poids total de ladite composition.

7. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit agent lipolytique est un agent activateur de l'enzyme adénylate cyclase.

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit agent activateur de l'enzyme adénylate cyclase est la forskoline ou un extrait de plante en contenant.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que la forskoline ou l'extrait de plante en contenant est utilisé à une concentration comprise entre 0,001% et 1%, de préférence entre 0,05% et 0,25%, en poids par rapport au poids total de ladite composition.

5 10. Utilisation selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce que ledit extrait contenant de la forskoline est un extrait de *Coleus forskohlii* ou *Plectranthus barbatus*.

10 11. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'agent activateur de l'adénylate cyclase est un extrait de la plante *Tephrosia purpurea*, à une concentration comprise entre 0,001 % et 5 % en poids, de préférence entre 0,01 % et 5 % en poids par rapport au poids total de ladite composition.

15 12. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit agent lipolytique est un agent inhibiteur de l'enzyme phosphodiesterase.

13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit agent inhibiteur de la phosphodiesterase est une xanthine, en particulier la 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine ou IBMX, la caféine ou la théophylline.

20 14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ladite xanthine est utilisée à une concentration comprise entre 0,001 % et 10 % en poids, de préférence comprise entre 0,01 % et 1 % en poids par rapport au poids de ladite composition.

25 15. Procédé de traitement cosmétique destiné à obtenir un effet amincissant du corps humain, caractérisé en ce qu'il consiste à appliquer sur les parties du corps où ledit effet est recherché une quantité efficace d'une composition cosmétique contenant de la phytosphingosine ou l'un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate.

30 16. Procédé de traitement cosmétique selon la revendication 15, caractérisé en ce que ladite composition cosmétique contient en outre au moins un agent lipolytique cosmétiquement acceptable.

35 17. Procédé de traitement cosmétique selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'agent lipolytique est choisi dans le groupe constitué par l'AMPc et ses dérivés, les activateurs d'adénylate cyclase, en particulier les extraits de *Tephrosia purpurea*, la forskoline et les extraits de plante en contenant tels que les extraits de *Coleus forskohlii* ou

Plectranthus barbatus, et les inhibiteurs de la phosphodiesterase, en particulier les xanthines, notamment la 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine ou IBMX, la caféine et la theophylline, ledit agent lipolytique étant présent dans ladite composition à une concentration telle que définie dans les revendications 6, 9 et 14.

18. Composition cosmétique, notamment destinée à réduire les surcharges graisseuses sous-cutanées, caractérisée en ce qu'elle contient, à titre d'agents actifs,

- de la phytosphingosine ou l'un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate, et

- au moins un agent lipolytique choisi dans le groupe constitué par l'AMPc et ses dérivés lipolytiques cosmétiquement acceptables, les agents activateurs de l'enzyme adénylate cyclase et les agents inhibiteurs de l'enzyme phosphodiesterase,

dans un véhicule cosmétiquement acceptable.

19. Composition cosmétique selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle contient de 0,001 à 1 %, et de préférence de 0,05 à 0,5 %, en poids de phytosphingosine ou de l'un de ses sels cosmétiquement acceptables, en particulier son chlorhydrate.

20. Composition cosmétique selon la revendication 18 ou 19, caractérisée en ce que l'agent lipolytique est l'AMPc ou l'un de ses dérivés cosmétiquement acceptables, choisi de préférence parmi ses sels et ses dérivés acylés, notamment un dérivé mono- ou dibutyryle.

21. Composition cosmétique selon la revendication 20, caractérisée en ce que l'AMPc ou son dérivé lipolytique est présent à une concentration comprise entre 0,001 % et 5 % en poids par rapport au poids total de ladite composition.

22. Composition cosmétique selon la revendication 18, caractérisée en ce que l'agent lipolytique est un agent activateur de l'enzyme adénylate cyclase.

23. Composition cosmétique selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit agent activateur de l'enzyme adénylate cyclase est la forskoline ou un extrait de plante en contenant.

24. Composition cosmétique selon la revendication 23, caractérisée en ce que la forskoline ou l'extrait en contenant est présent à

une concentration comprise entre 0,001% et 1%, et de préférence entre 0,05% et 0,25% en poids par rapport au poids total de ladite composition.

25. Composition cosmétique selon la revendication 23 ou 24, caractérisée en ce que l'extrait de plante est un extrait de *Coleus forskohlii* ou *Plectranthus barbatus*.

26. Composition cosmétique selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit agent activateur de l'adénylate cyclase est un extrait de la plante *Tephrosia purpurea*.

27. Composition cosmétique selon la revendication 26, caractérisée en ce que l'extrait de *Tephrosia purpurea* est présent à une concentration comprise entre 0,001 % et 5 % en poids, de préférence entre 0,01 % et 5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

28. Composition cosmétique selon la revendication 18, caractérisée en ce que l'agent lipolytique est un agent inhibiteur de l'enzyme phosphodiesterase.

29. Composition cosmétique selon la revendication 28, caractérisée en ce que ledit agent inhibiteur de la phosphodiesterase est une xanthine, en particulier la 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine ou IBMX, la caféine ou la théophylline.

30. Composition cosmétique selon la revendication 29, caractérisée en ce que ladite xanthine est présente à une concentration comprise entre 0,001 % et 10 %, de préférence comprise entre 0,01 % et 1 %, en poids par rapport au poids total de la composition.

FIGURE 1

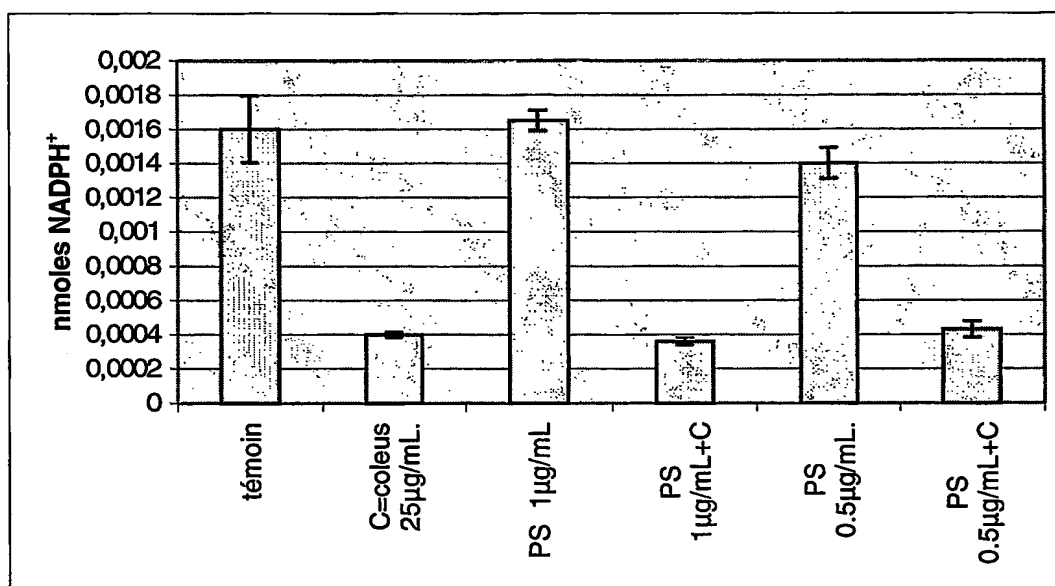
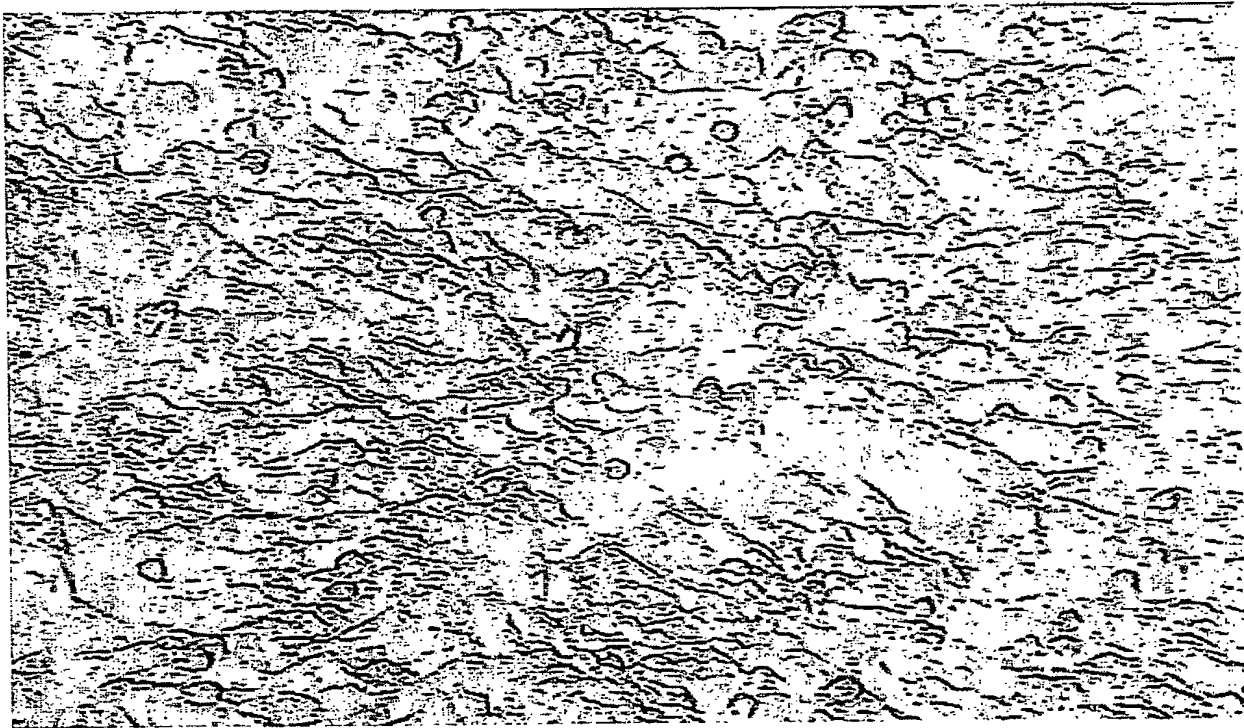
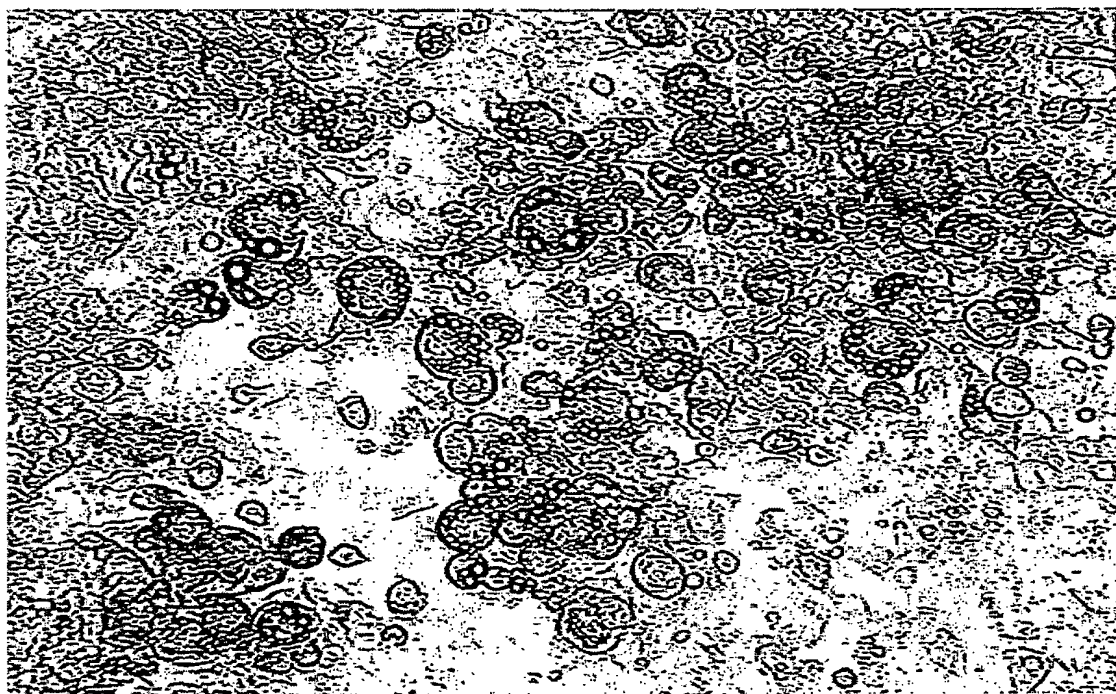


FIGURE 2



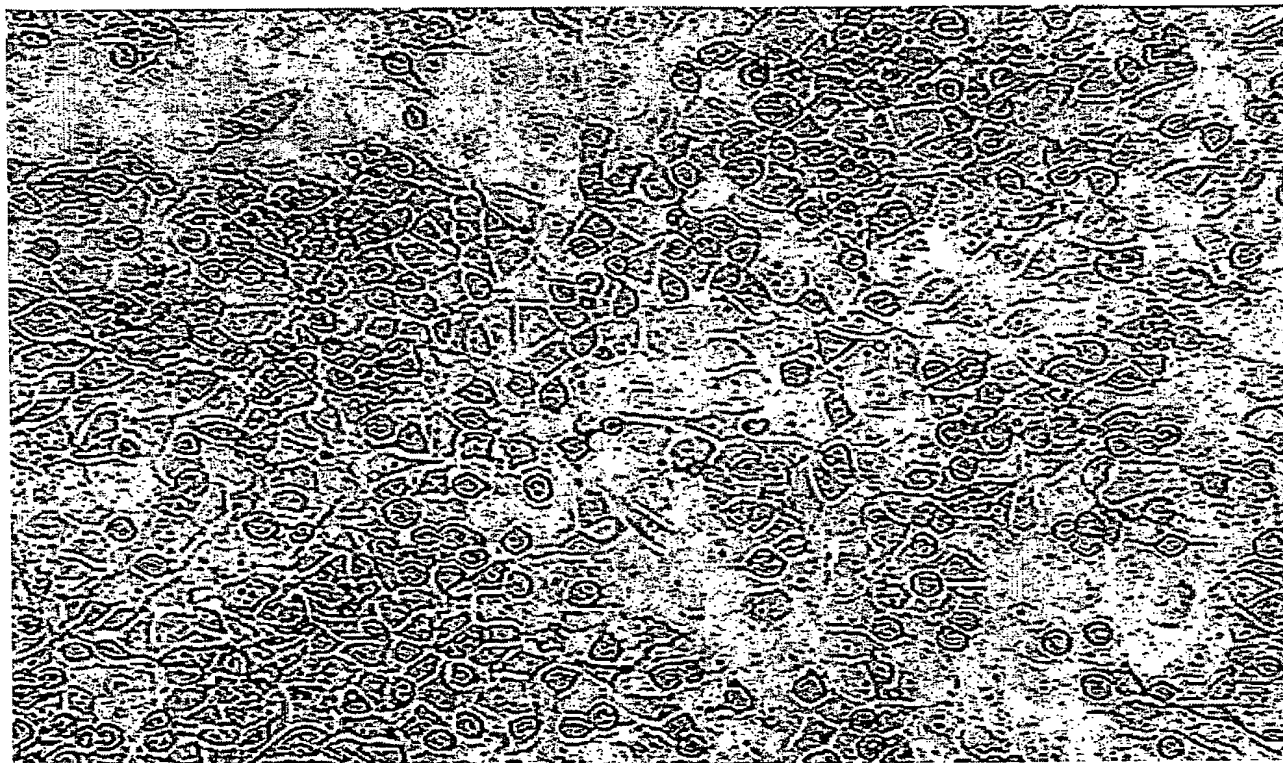
BEST AVAILABLE COPY

FIGURE 3



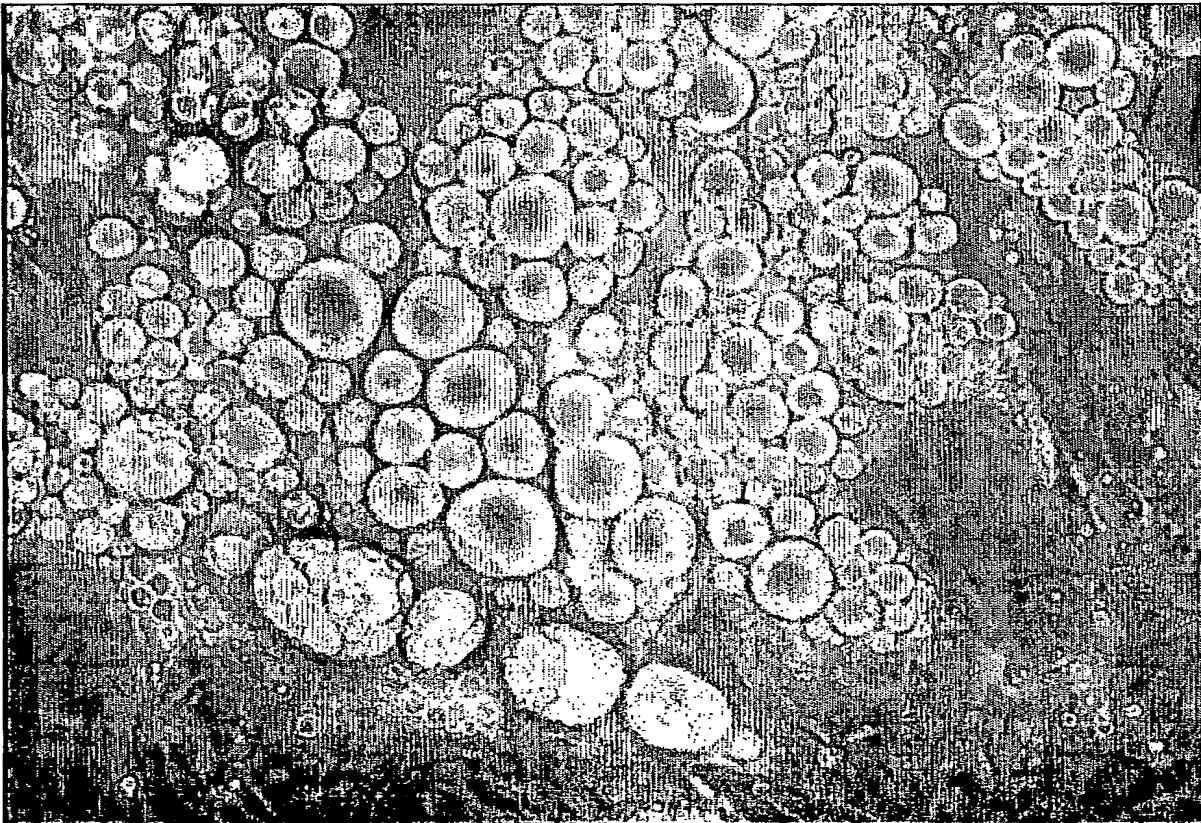
BEST AVAILABLE COPY

FIGURE 4



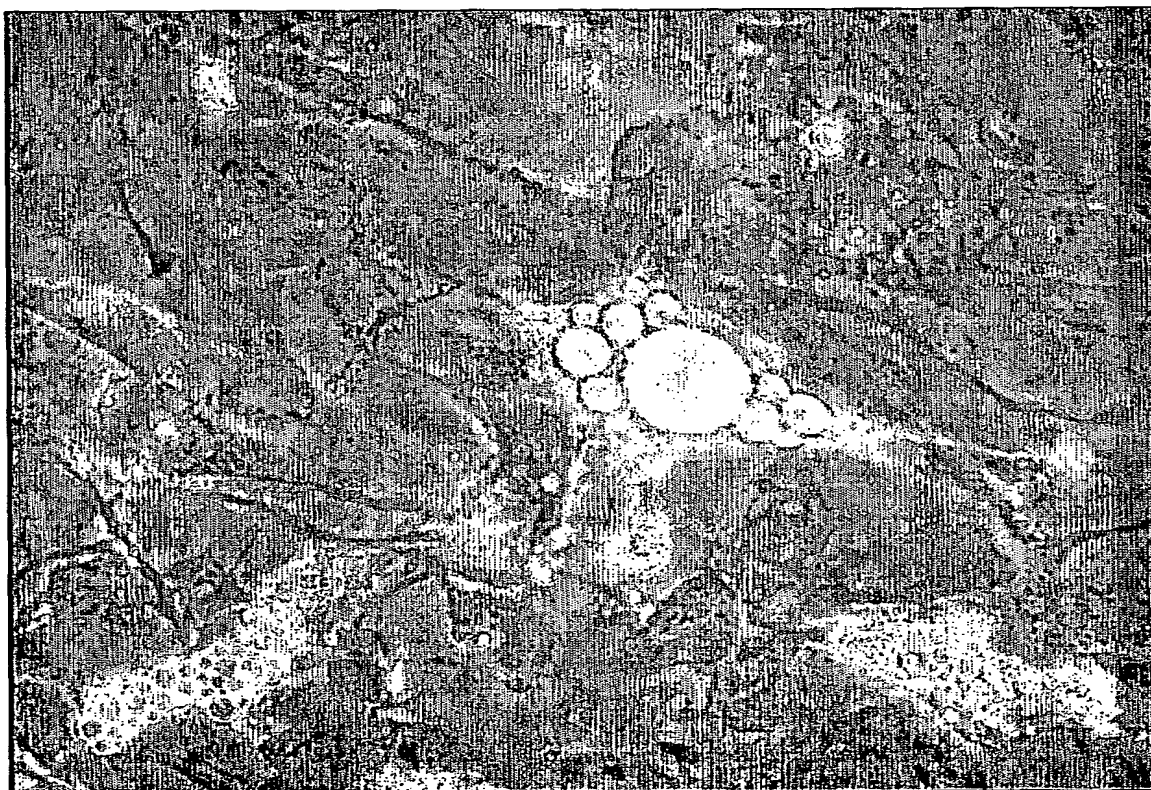
BEST AVAILABLE COPY

FIGURE 5



BEST AVAILABLE COPY

FIGURE 6



BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/00656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 578 641 A (JACKSON SIMON M ET AL) 26 November 1996 (1996-11-26) claim 1; example 1 -----	1-30
A	WO 95 03780 A (PARFUMS CHRISTIAN DIOR) 9 February 1995 (1995-02-09) cited in the application examples 3-5 -----	1-30

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 2003

Date of mailing of the international search report

07/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nopper-Jaunky, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/00656

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5578641	A	26-11-1996	AU 684282 B2	11-12-1997
			AU 6677494 A	08-11-1994
			CA 2159201 A1	27-10-1994
			DE 69407403 D1	29-01-1998
			DE 69407403 T2	09-04-1998
			WO 9423694 A1	27-10-1994
			EP 0695167 A1	07-02-1996
			ES 2110747 T3	16-02-1998
			JP 8508742 T	17-09-1996
			NZ 265618 A	27-07-1997
			ZA 9402678 A	19-10-1995
WO 9503780	A	09-02-1995	FR 2708198 A1	03-02-1995
			AU 684532 B2	18-12-1997
			AU 7386794 A	28-02-1995
			CA 2168044 A1	09-02-1995
			DE 69403800 D1	17-07-1997
			DE 69403800 T2	22-01-1998
			EP 0711141 A1	15-05-1996
			WO 9503780 A1	09-02-1995
			JP 9505272 T	27-05-1997
			US 5709864 A	20-01-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/00656

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K7/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61K A61Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 578 641 A (JACKSON SIMON M ET AL) 26 novembre 1996 (1996-11-26) revendication 1; exemple 1 ---	1-30
A	WO 95 03780 A (PARFUMS CHRISTIAN DIOR) 9 février 1995 (1995-02-09) cité dans la demande exemples 3-5 -----	1-30

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 juin 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/07/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nopper-Jaunky, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. internationale No

PCT/FR 03/00656

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5578641	A	26-11-1996	AU 684282 B2	11-12-1997
			AU 6677494 A	08-11-1994
			CA 2159201 A1	27-10-1994
			DE 69407403 D1	29-01-1998
			DE 69407403 T2	09-04-1998
			WO 9423694 A1	27-10-1994
			EP 0695167 A1	07-02-1996
			ES 2110747 T3	16-02-1998
			JP 8508742 T	17-09-1996
			NZ 265618 A	27-07-1997
			ZA 9402678 A	19-10-1995
WO 9503780	A	09-02-1995	FR 2708198 A1	03-02-1995
			AU 684532 B2	18-12-1997
			AU 7386794 A	28-02-1995
			CA 2168044 A1	09-02-1995
			DE 69403800 D1	17-07-1997
			DE 69403800 T2	22-01-1998
			EP 0711141 A1	15-05-1996
			WO 9503780 A1	09-02-1995
			JP 9505272 T	27-05-1997
			US 5709864 A	20-01-1998